

ILSE ZOBEL

DIE WIRKUNG VON DEHYDROEPIANDROSTERON UND SEINEN KONJUGATEN
AUF DIE GLUCOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE MENSCHLICHER
ERYTHROZYTEN

1973

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554426_0081

Aus der Universitäts-Frauenklinik Mainz
Abteilung für Experimentelle Endokrinologie
(Direktor: Prof. Dr. V. Friedberg)

Die Wirkung von Dehydroepiandrosteron und seinen
Konjugaten auf die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
menschlicher Erythrozyten

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von Ilse Zobel
aus Ludwigshafen/Rhein

Mainz 1972

Dekan: Professor Dr. K.H.Bäßler
Referent: Professor Dr. Georg W. Oertel
Korreferent: Professor Dr. Volker Friedberg

Tag der mündlichen
Prüfung:

11.1.1973



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <u>Einführung</u>	1
1. Die Bedeutung der Glucose-6-Phosphat- Dehydrogenase	1
2. Die Bedeutung von Dehydroepiandrosteron . .	4
II. <u>Problemstellung</u>	8
III. <u>Beschreibung der Versuche</u>	9
1. Bestimmung der G-6-PDH-Aktivität in Ery- throzyten gesunder Normalpersonen	9
2. Einfluß von DHEA und seinen konjugaten auf die G-6-PDH in nicht-hämolysierten Ery- throzyten	10
3. Einfluß von DHEA und seinen Konjugaten auf eine gereinigte G-6-PDH aus menschlichen Erythrozyten	11
IV. <u>Ergebnisse</u>	15
V. <u>Diskussion</u>	22
VI. <u>Zusammenfassung</u>	28
VII. <u>Literaturverzeichnis</u>	29

I. Einführung

1. Die Bedeutung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

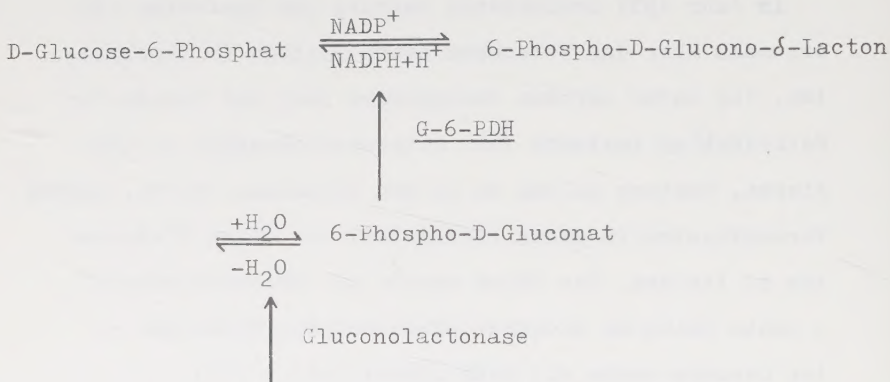
Im Jahr 1931 berichteten Warburg und Christian (50) erstmals über das Vorkommen eines Systems in Hämolyysaten, das unter aeroben Bedingungen oder bei Zusatz von Methylenblau imstande ist, Glucose-6-Phosphat zu oxydieren. Warburg gelang es in den folgenden Jahren, dieses Fermentsystem in einen Proteinteil und einen H^+ -Acceptor zu trennen. Das Enzym nannte er "Zwischenferment" - heute heißt es Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase -; das Coenzym wurde als NADP identifiziert (52).

Das Zwischenferment, das aus Unterhefe angereichert wurde (26), hat beim nicht-glykolytischen Abbau der Glucose eine bedeutende Funktion. Es katalysiert die Dehydrierung von Glucose-6-Phosphat zu 6-Phospho-Gluconat (52) und leitet damit den Pentose-Phosphat-Zyklus ein. Erst später wurde nachgewiesen, daß diese Reaktion in

Erläuterung der verwendeten Abkürzungen:

DHEA	Dehydroepiandrosteron
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
G-6-PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	Reduzierte Form von NADP
PPZ	Pentose-Phosphat-Zyklus

zwei Schritten abläuft (8), nämlich mit 6-Phospho-Gluconsäure- δ -Lacton als Primärprodukt, dessen Umwandlung zu 6-Phospho-Gluconat durch eine Gluconolactonase katalysiert wird. In einem NADPH-regenerierenden System konnte die Reversibilität nachgewiesen werden:



G-6-PDH ist absolut spezifisch in Bezug auf Substrat und H^+ -Acceptor.

Der von G-6-PDH eingeleitete Abbau der Glucose gilt übrigens nicht als Hauptstoffwechselweg. Beispielsweise beträgt der Anteil des PPZ am Glucoseabbau in den Erythrozyten nur 10 % (49). Trotzdem ist dieser Weg im Stoffwechselgeschehen insofern von entscheidender Bedeutung, als er wichtige Zwischenprodukte für andere Synthesen und Reaktionen liefert, wie etwa Baustoffe zur Bildung von Ribose und Desoxyribose (42,12).

Der PPZ ist überdies der wichtigste NADPH-Generator. Durch die Reduktion von NADP werden die für folgende Reaktionen wichtigen H^+ -Ionen bereitgestellt:

1. Bei der Fettsäuresynthese (deutlich zu verfolgen in der lactierenden Mamma und in der Leber) steigt der G-6-PDH-Gehalt wie auch der NADPH-Gehalt rapide an. Die beim Diabetes mellitus reduzierte Lipogenese in der Leber ist bedingt durch eine verminderte NADPH-Bildung im PPZ, da die Fettsäuresynthese aus Acetat-1- ^{14}C im Leberhomogenat alloxandiabetischer Ratten, inkubiert mit G-6-P, durch NADP-Zusatz normalisiert werden kann (40).

2. NADPH besitzt große Bedeutung für reduktive Carboxylierungsreaktionen, besonders bei der Resynthese von Hexose aus Pyruvat und Lactat in der Leber.

3. Bei der Reduktion der Folsäure zu Tetrahydrofolsäure (= akt. C_1 -Fragment) fungiert NADPH als H^+ -Ionen-Donator. Die reduzierte Folsäure stellt das Coferment dar, das transaminierende und transmethylierende Funktionen bei der Purinsynthese ausübt.

4. NADPH ist eine der bedeutendsten Determinanten der Corticosteroidsynthese. Es ist beteiligt an der Abspaltung von Seitenketten des Cholesterins und der Hydroxylierung von Steroiden. Auch bei der Oestrogensynthese durch Aromatisierung neutraler Steroide und bei der Tyrosinbildung stellt NADPH die notwendigen H^+ -Ionen.

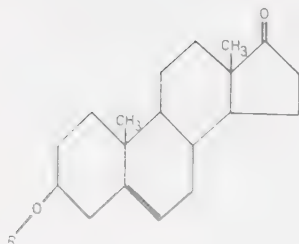
5. Die Reduktion disulfidischer Brücken, wie etwa von Gluthation und Cystin, benötigt NADPH. Ein Überschuß von NADPH bewahrt zudem SH-Gruppen vor allzu rascher

Oxydation und sichert damit ihre Aktivität. Außerdem führt NADPH zur Spaltung disulfidischer Brücken, sodaß die Insulinaktivität durch NADPH gehemmt wird.

2. Die Bedeutung von Dehydroepiandrosteron

Bei der Untersuchung von Stoffen, welche die G-6-PDH und damit den PPE mit seiner Bedeutung für entscheidende Reaktionen im Intermediärstoffwechsel negativ beeinflussen, wurde festgestellt, daß DHEA bzw. DHEA-Verbindungen die Aktivität des Enzyms hemmen (19,20,22,47).

Dehydroepiandrosteron (3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on) stellt das mengenmäßig bedeutendste Steroid im menschlichen Blut dar. Täglich werden 10 - 40 mg dieses



3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on

Freies DHEA: R = -H

Sulfat: R = -SO₃⁻

Sulfatid: R = $\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-O-CO-R}_1 \\ | \\ \text{CH-O-CO-R}_2 \\ | \\ \text{-SO}_3\text{-CH}_2 \end{array}$

Glucuronosid R = -CH₂-(CHOH)₄-COO⁻

Formelschema 1. DHEA und seine Konjugate

C₁₉-Steroids von der Nebennierenrinde sezerniert (21). Es erreicht im Plasma gesunder Männer und Frauen eine Konzentration von 250 μ g/100 ml bzw. 150 μ g/100 ml (48). Im Gegensatz zu anderen Steroiden aus der Nebenniere und den Gonaden, die als freie Verbindungen ihre Wirkung ausüben, wird das DHEA als Sulfokonjugat mit lipophilen Eigenschaften ausgeschüttet (27).

In Bezug auf sein physikochemisches Verhalten und seine Zusammensetzung gleicht das Sulfokonjugat den Steroidestern einer Diglycerid-Schwefelsäure oder "Sulfatidsäure" (28,31). Der Anteil des freien DHEA und des DHEA-glucuronosids an der Gesamtmenge des zirkulierenden DHEA beträgt im Blut von Normalpersonen nur etwa 1 % bzw. 0,5 % (7,15).

Die Isolierung des endogenen Sulfatids, das im Blut an Proteine der Albuminfraktion gebunden ist (32), wird durch die Unbeständigkeit derartiger Verbindungen erschwert.

Oral oder parenteral verabreichtes DHEA-sulfat wird in-vivo schnell in das lipophile Sulfokonjugat überführt (29,34). Seine Stoffwechselprodukte, die auch denjenigen des freien DHEA's und seines Glucuronosids entsprechen, werden im Harn (2) und durch die Haut im Schweiß (37) ausgeschieden. Zu den wichtigsten Metaboliten gehören neben anderen Ring-A-gesättigten C₁₉-Steroiden vor allem die 17-Ketosteroide Androsteron (3α -Hydroxy-5 α -androstan-17-on) und Etiocholanolon (3α -Hydroxy-4 α -androstan-17-on).

Bei ihrer Entstehung erfolgt zunächst eine Dehydrierung in Ring A zur Oxydationsstufe des Androstendions (4-Androsten-3,17-dion). Diese Verbindung und Testosteron (17 β -Hydroxy-4-androsten-3-on), die wie ihre Vorstufen DHEA und Androstendiol (5-Androsten-3 β ,17 β -diol) einem durch 17 β -Hydroxysteroid-oxydoreduktasen gesteuerten Redoxgleichgewicht unterliegen, sind ihrerseits Vorläufer für die Biosynthese der Oestrogene (53,6,41).

Während also einerseits das besagte Sulfokonjugat des Androstendions einer fortschreitenden Reduktion zu gesättigten C₁₉-Steroiden unterworfen ist, führen andererseits Hydroxylierung an C-19, Dehydrierung und Aromatisierung zu sulfokonjugierten Oestrogenen (36). Diese Synthese deckt sich mit der experimentell bewiesenen Bildung von Androgenen und Oestrogenen aus sulfokonjugiertem DHEA (DHEA-sulfat und/oder DHEA-sulfatid) (3,25, 18,33,34,39).

Früher wurde der Konjugation von Steroiden nur die Funktion einer Elimination überschüssiger Steroidhormone oder deren Metaboliten zugeschrieben. Im Gegensatz dazu stehen obengenannte Untersuchungen, wonach eine indirekte physiologische Wirkung über den Metabolismus von sulfokonjugiertem DHEA zu freien und sulfokonjugierten Androgenen und Oestrogenen ausgeübt wird.

Daneben kommt DHEA-sulfatid möglicherweise eine Bedeutung als Regulator der G-6-PDH zu. Mehreren Untersuchungen zufolge ist nämlich DHEA ein potenter Inhi-

bitor dieses Enzyms (16,19,20,22,47). So wurde bei Aktivitätssteigerung der G-6-PDH unter gewissen pathophysiologischen Bedingungen eine bemerkenswerte Erniedrigung der DHEA-Ausscheidung gefunden (43-45).

II. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß von DHEA und seinen verschiedenen Konjugaten auf die G-6-PDH menschlicher Erythrozyten untersucht werden.

Aus früheren Arbeiten (19, 20, 22) war bekannt, daß DHEA ein wirkungsvoller Hemmer des Enzyms darstellt. Was DHEA-sulfat angeht, so blieb es im in-vitro-Test wirkungslos (47). Auf der anderen Seite fand man unter physiologischen Bedingungen bei erhöhter G-6-PDH-Aktivität erniedrigte DHEA-Spiegel (4, 42). Im menschlichen Plasma und im Urin aber liegt DHEA fast ausschließlich als Sulfokongugat vor.

So dienten die nachstehenden Untersuchungen dem Nachweis, daß das endogene Sulfokongugat des DHEA nicht mit DHEA-sulfat identisch ist. Durch Vergleich des hemmenden Einflusses von freiem DHEA, DHEA-sulfat, von synthetischem und endogenem DHEA-sulfatid und DHEA-glucuronosid sollte der eigentliche, physiologische Inhibitor eruiert werden.

III. Beschreibung der Versuche

1. Bestimmung der G-6-PDH-Aktivität in Erythrozyten gesunder Normalpersonen

Die G-6-PDH-Aktivität wurde mit der Biochemica-Testpackung der Firma C.F.Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim, bestimmt. Die Aktivitätsmessung erfolgte im Photometer (Eppendorf) durch Photometrie gebildeten NADPH's bei 366 $m\mu$. Eine Enzymeinheit ist dabei definiert als die Enzymmenge, die bei 25° 1 μ Mol Substrat in 1 Min. umsetzt, bezogen auf 1 ml Körperflüssigkeit.

$$1 \text{ U/ml} = \frac{1 \mu\text{Mol Substratumsatz}}{1 \text{ M} \times 1 \text{ m}}$$

Im Einzelnen verfuhr man wie folgt:

0,2 ml Blut wurden dreimal mit je 2 ml physiologischer Kochsüßwasserlösung gewaschen und nach jeder Waschung 10 Min. bei 3 000 U/Min. zentrifugiert. Die Erythrozyten wurden sodann in 0,5 ml einer 0,02 %igen Digitoninlösung suspendiert, 15 Min. bei 4°C gehalten und erneut zentrifugiert. Vom Überstand wurde 0,1 ml entnommen, mit 3 ml 0,05 M Triethanolamin/0,005 M EDTA-Puffer von pH 7,6 und 0,1 ml 0,01 M NADP-Lösung versetzt und 5 Min.

bei 25°C inkubiert. Kurz vor der Extinktionsmessung, die bei 366 μ m in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke erfolgte, wurden 0,05 ml 0,031 $\underline{M}$ G-6-P zugesetzt. Die Durchschnittsaktivität der G-6-PDH lag bei weiblichen Normalpersonen um 368 mU, oder - bezogen auf die Erythrozytenzahl in 1 ml Blut - 90,7 mU/ 10^9 Erythrozyten, bei männlichen Normalpersonen um 407 mU bzw. 82 mU/ 10^9 Erythrozyten.

Um den Einfluß von DHEA und seinen Konjugaten auf die G-6-PDH in menschlichen Erythrozyten zu überprüfen, versetzte man 0,1 ml Hämolysat mit 3 ml Pufferlösung und 0,02 ml Dioxan, das die jeweiligen Steroide enthielt, und bebrütete 15 Min. bei 37°C. Die Konzentration von freiem DHEA, DHEA-glucuronosid, DHEA-sulfat und synthetischem DHEA-sulfatid (30) entsprach jeweils einer 10^{-5} $\underline{M}$, 10^{-6} $\underline{M}$ oder 10^{-7} $\underline{M}$ Lösung. Danach wurde der Enzymtest wie oben beschrieben durchgeführt.

2. Einfluß von DHEA und seinen konjugaten auf die G-6-PDH in nicht-hämolysierten menschlichen Erythrozyten

Eine weitere Versuchsreihe sollte zeigen, in welchem Maße die verschiedenen DHEA-Konjugate durch die intakte

Herkunft der Steroide:

freies DHEA: Mann Research, dt. Vertretung: W. Gellert,
Braunschweig.

DHEA-sulfat und -glucuronosid: IKA-Farm, Tel Aviv.

Erythrozytenmembran penetrieren und anschließend ihren hemmenden Effekt auf die Aktivität der intracellulären G-6-PDH ausüben.

Zu 0,1 ml gewaschenen, menschlichen Erythrozyten wurden 3 ml isotonische Kochsalzlösung und 0,02 ml Dioxan mit dem jeweiligen Steroid zugegeben. Die Endkonzentration der Steroide belief sich auf 10^{-5} M. Jeder Ansatz wurde 15 Min. bei 37°C bebrütet. Man wusch die Erythrozyten, hämolysierte sie und unterwarf das Hämolysat dem Enzymtest.

3. Einfluß von DHEA und seinen Konjugaten auf eine gereinigte G-6-PDH aus menschlichen Erythrozyten

In der dritten Versuchsreihe wurde die Wirkung von DHEA und seinen Konjugaten auf die gereinigte G-6-PDH aus menschlichen Erythrozyten geprüft.

Zur Reinigung der G-6-PDH aus menschlichen Erythrozyten (20) wurden 500 ml Blut einer Normalperson mit 125 ml Citratlösung (1,32 g Natriumcitrat, 0,44 g Zitronensäure und 1,47 g Dextrose in 100 ml) versetzt. Die Suspension wurde sodann 10 Min. bei 2 000 g zentrifugiert, das Überstehende Plasma entfernt und der Niederschlag mit den Erythrozyten 3 x mit 4 Volumen isotonischer Kaliumchloridlösung gewaschen, die mit Triäthanolamin auf pH 7,4 gebracht war. Die Hämolysen der gewaschenen Erythrozyten wurde durch Zusatz von 4 Teilen kaltem aqua dest. erreicht.

Man verdünnte mit Wasser bis zu einer Hämoglobinkonzentration des Hämolysats von 0,035 g pro ml und ließ es 45 Min. stehen.

Danach erfolgte die erste Ammoniumsulfatfällung durch Zugabe von 19,4 g Ammoniumsulfat pro 100 ml Lösung, so daß man eine 35 %ige Sättigung erhielt. Nach 5 Min. wurde das Gemisch 30 Min. bei 25 000 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Niederschlag verworfen. Durch Hinzufügen von 11,8 g Ammoniumsulfat pro 100 ml Lösung wurde im Überstand eine 55 %ige Sättigung erreicht. Nach 5 Min. wurde 8 Min. bei 18 000 g zentrifugiert und der Niederschlag mit ungefähr 40 ml Triäthanolaminhydrochlorid auf pH 7,6 gebracht und nochmals 8 Min. bei 4 000 g zentrifugiert.

Zu 1 ml des Überstands gab man sodann 14 ml Calciumphosphatgel, lies 1. Min. stehen und zentrifugierte 20 Min. bei 18 000 g. Der Niederschlag wurde anschließend mit 10 Volumen 0,1 M Phospatpuffer von pH 7,6 eluiert. Durch Zugabe von 16,4 g Ammoniumsulfat pro 100 ml Eluat wurde eine 30 %ige Sättigung erzielt. Die Lösung blieb 5 Min. stehen und wurde dann bei 18 000 g 10 Min. zentrifugiert und der Überstand mit weiteren 11,7 g Ammoniumsulfat pro 100 ml zwecks 50 %iger Sättigung versetzt. Nach erneutem Zentrifugieren für 10 Min. bei 18 000 g löste man den Niederschlag in 3 ml 0,25 M Glycylglycinpuffer von pH 7,5 und bestimmte den Proteingehalt nach Warburg u.a. (51).

Die Anfangsaktivität der Enzympräparation betrug 0,234

I.E./mg Protein, die Aktivität nach der Reinigung dagegen 98,5 I.E./mg Protein, was einer 441-fachen Anreicherung der G-6-PDH entspricht. Die Gesamtausbeute belief sich auf 13,5 % der ursprünglichen Enzymaktivität.

Durch die Reinigung wurde 6-Phospho-gluconat-dehydrogenase weitgehend entfernt, wie ihre Bestimmung nach Glock und Mclean (10) ergab. Die Verunreinigung durch 6-Phospho-gluconat-dehydrogenase betrug 0,09 % der G-6-PDH-Aktivität.

Die Michaeliskonstante der gereinigten G-6-PDH, bezogen auf G-6-P, ergab den K_M -Wert $4,1 \times 10^{-5}$ M.

Mit der gereinigten G-6-PDH wurden folgende Experimente durchgeführt:

Zu 0,05 - 0,1 ml des Enzyms, die mit 0,05 M Triethanolamin/0,005 M EDTA-Puffer von pH 7,6 auf 3,0 ml aufgefüllt wurden, gab man 0,1 ml 0,01 M NADP-Lösung und 0,05 ml 0,031 M G-6-P-Lösung in verschiedenen Konzentrationen hinzu, sowie 0,02 ml Dioxan mit DHEA bzw. seinen Konjugaten.

Als mögliche Inhibitoren wurden getestet: freies DHEA, DHEA-glucuronosid, DHEA-sulfat, synthetisches DHEA-sulfatid (30), biosynthetisches DHEA-sulfatid (31), aus menschlichen Nebennieren isoliertes DHEA-sulfatid (27) und ein Gemisch endogener, lipophiler Sulfokonjugate. Die Konzentration der einzelnen Inhibitoren bewegte sich zwischen 10^{-6} M und 5×10^{-4} M.

Man bestimmte wie üblich die Aktivität des gereinigten Enzyms, wobei entweder ein überschuss von NADH und begrenzte G-6-P-Konzentrationen benutzt wurden oder umgekehrt ein überschuss an G-6-P und begrenzte NADP-Konzentrationen (17).

IV. Ergebnisse

Abb. 1 und 2 und Tab. 1 zeigen die Hemmung der G-6-PDH in menschlichen Erythrozyten durch DHEA und seine Konjugate. Der Abfall der Enzymaktivität wurde in Prozent der entsprechenden Leerwerte angegeben.

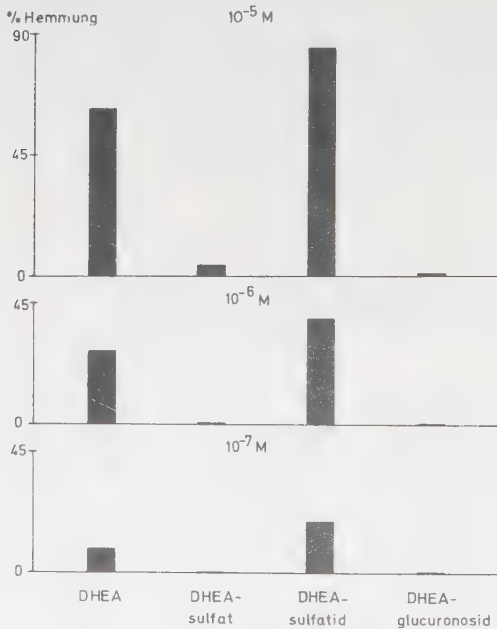
Tabelle 1

	% der Hemmung bei einer Konzentration von		
	10^{-5} M	10^{-6} M	10^{-7} M
DHEA	72	87	9
DHEA-glucuronosid	1	0	0
DHEA-sulfat	3	0	0
DHEA-sulfatid	84	79	100

Tab. 1: Hemmung der G-6-PDH in menschlichen Erythrozyten durch DHEA und seine Konjugate

Abbildung 1

Abb.1 Hemmung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in menschlichen Erythrozyten durch DHEA und seine Konjugate



In Tab. 2 sind die Ergebnisse des Penetrationversuches aufgetragen. Es zeigte sich, daß nur DHEA-sulfatid eine signifikante Hemmung der G-6-PDH bewirkte, die rund 11 % betrug.

Abbildung 2

Hemmung der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase in menschlichen Erythrozyten durch freies und konjugiertes DHEA ($10^{-5}M$)

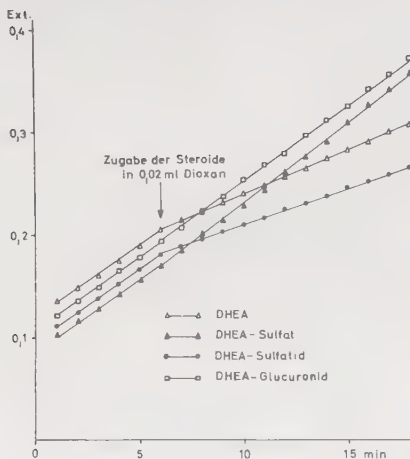


Tabelle 2

% der Hemmung bei einer $10^{-5} M$ Konzentration

DHEA	3 %
DHEA-sulfat	3 %
DHEA-sulfatid	11 %

Tab. 2: % der Hemmung der G-6-PDH in menschlichen Erythrozyten durch DHEA und seine Konjugate bei intakter Zellmembran

Abbildung 3

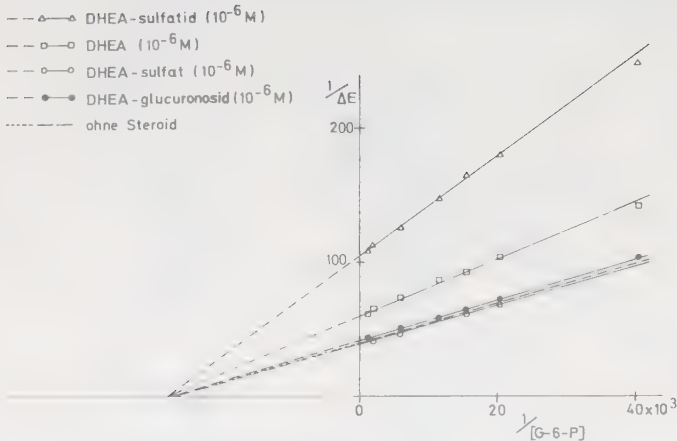


Abb 3 Hemmung der G-6-PDH menschlicher Erythrozyten durch DHEA und seine Konjugate bei einem Überschuß an NADP und begrenzten Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat

In Abb. 3 sind (in einem Lineweaver-Burk-Diagramm) die reziproken Werte der Reaktionsgeschwindigkeit einer gereinigten G-6-PDH bei abnehmender Konzentration von Glucose-6-Phosphat und konstanter Konzentration von NADP in Gegenwart von freiem DHEA, DHEA-sulfat, DHEA-sulfatid und DHEA-glucuronosid - jeweils in einer 10^{-6} M Konzentration - aufgetragen.

Abb. 4 zeigt den hemmenden Einfluß von DHEA-sulfatiden verschiedener Herkunft und von einem Gemisch aus Plasmalipiden und DHEA-sulfat auf die Enzymaktivität unter gleichen Bedingungen.

Abbildung 4

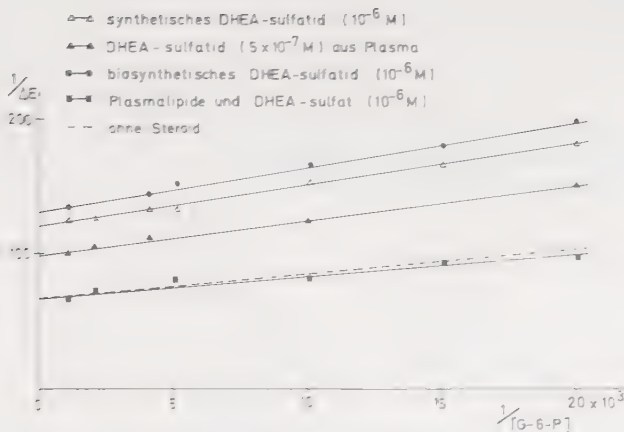


Abb 4 Hemmung der G-6-PDH menschlicher Erythrozyten durch DHEA-sulfatide verschiedenen Ursprungs bei einem Überschuß an NADP und begrenzten Konzentrationen von G-6-P

Abbildung 5

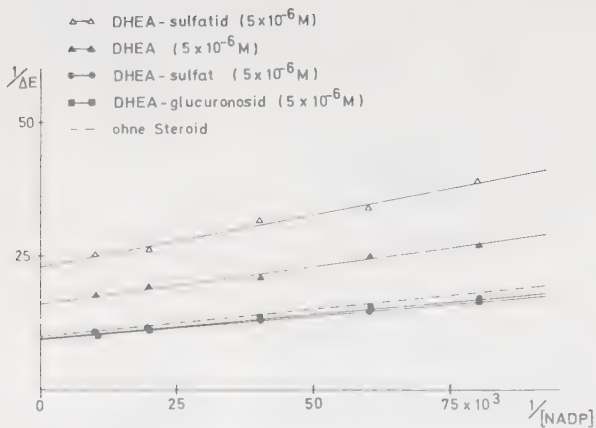


Abb.5 Hemmung der G-6-PDH menschlicher Erythrozyten durch DHEA und seine Konjugate bei einem Überschuß an G-6-P und begrenzten Konzentrationen von NADP

In Abb. 5 ist die Hemmung einer gereinigten G-6-PDH durch Steroide in $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ Konzentration bei einem Überschuß von G-6-P und abnehmender NADP-Konzentration dargestellt.

Abb. 6 zeigt ein Hunter-Downs-Diagramm zur Ermittlung der Hemmkonstante K_i , wobei die Substratkonzentration S gegen die Inhibitorkonzentration i , multipliziert mit $\frac{\alpha}{1-\alpha}$, aufgetragen wird (α = Quotient der Reaktionsgeschwindigkeiten in An- bzw. Abwesenheit der Hemmsubstanz).

Abbildung 6

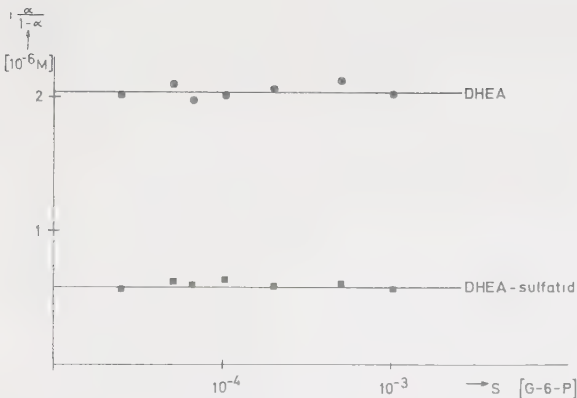


Abb.6 HUNTER-DOWNS-Diagramm zur Bestimmung des K_i -Wertes für DHEA und synthetisches DHEA-sulfatid

V. Diskussion

Wie die in den Abb. 1-5 enthaltenen Ergebnisse zeigen, bewirkte das synthetische DHEA-sulfatid die weitaus größte Hemmung der G-6-PDH in menschlichen Erythrozyten, während DHEA-sulfat und DHEA-glucuronosid keinen Einfluß ausübten. Einen ähnlichen Effekt wie synthetisches DHEA-sulfatid zeigten das biosynthetische und das endogene Sulfatid, wobei für geringfügig abweichende Werte dieser Substanzen sicher Verunreinigungen durch andere Steroid-sulfatide verantwortlich zu machen sind.

In der ersten Versuchsreihe bewirkte DHEA-sulfatid noch bei einer Konzentration von 10^{-7} M eine 19 %ige Hemmung. Diese Konzentration aber stellt kaum ein Zehntel des physiologischen Plasmaspiegels von sulfokonjugiertem DHEA dar (50 bis 250 $\mu\text{g}/100$ ml oder $1,7 - 8,7 \times 10^{-6}$ M) (48,13). Im Vergleich dazu führte das freie DHEA bei gleicher Konzentration nur zu einer 9 %igen Hemmung der Enzymaktivität. Diese Konzentration übersteigt den physiologischen Plasmaspiegel des freien Steroids, der mit $2 \mu\text{g}/100$ ml unter einer 10^{-7} M Konzentration liegt (7).

In der dritten Versuchsreihe wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Bei einer 5×10^{-6} M Konzentration nahm die Aktivität der gereinigten G-6-PDH unter Einfluß des DHEA-sulfatids um 51 % ab, unter dem Einfluß des freien Steroids dagegen nur um 33 %

Weiterhin ist von Bedeutung, daß auch durch Zusatz von endogenen Lipoiden, die man durch Hydrolyse der lipophilen Steroid-Sulfokongjugate gewann, das wasserlösliche DHEA-sulfat keine Enzymhemmung verursachte. Dies spricht gegen das Vorliegen von Komplexen aus Steroid-sulfat und Plasmalipoiden als endogene Inhibitoren der G-6-PDH.

Wie aus Tab. 2 zu ersehen ist, vermochte beim Penetrationsversuch nur das lipophile Konjugat die Erythrozytenmembran in signifikanter Menge zu durchdringen und eine 11 %ige Hemmung zu verursachen. Dagegen bewirkten freies Steroid und wasserlösliches Sulfat mit 3 % nur eine unerhebliche Hemmung des Enzyms.

Wie die Abb. 3-5 außerdem zeigen, liegen die reziproken Werte der Enzymaktivität, aufgetragen gegen die Substratkonzentration bei konstanten Mengen der hemmenden Steroide, auf einer Geraden, die sich in einem Punkt der Abszisse schneiden, was den Vorstellungen einer nicht-kompetitiven Hemmung entspricht (9).

Das gleiche Ergebnis erhielt man bei der Auswertung des Resultates nach der Methode von Hunter und Downs (14), Abb. 6. Die parallel zur Horizontalen verlaufenden Geraden schneiden die Ordinate bei dem Wert der Hemmkonstanten K_i , die für synthetisches DHEA-sulfatid z.B. mit $0,6 \times 10^{-6}$ M, für freies DHEA mit $2,1 \times 10^{-6}$ M ermittelt wurde. Der niedrigere K_i -Wert des DHEA-sulfatids drückt die höhere Affinität dieser Verbindung zum Enzym aus.

Da eine Präinkubation des Enzyms mit einer 5×10^{-6} M

Konzentration von DHEA bzw. DHEA-sulfatid in An- bzw. Abwesenheit von NADP und/oder G-6-P keine unterschiedliche Hemmung hervorrief, blieb die Reihenfolge des Reagenzienzusatzes ohne Bedeutung auf die Ergebnisse.

Inkubierte man das Enzym mit freiem DHEA oder seinem Sulfatid und NADP oder NADPH, so ergab sich im Verlauf der Spektrophotometrie ebenfalls keine Änderung der Anfangsabsorption. Ein Verbrauch von NADP oder NADPH durch steroid-umwandelnde Enzyme spielte demnach während der Messungen keine wesentliche Rolle.

Aus den Ergebnissen kann zusammenfassend der Schluß gezogen werden, daß bei der Regulation der G-6-PDH das lipophile DHEA-sulfatid die beherrschende Rolle spielen dürfte, während DHEA-sulfat keine Hemmung hervorruft und das freie Steroid nur in solch geringen Mengen vorkommt, daß es in-vivo kaum die Aktivität beeinflussen sollte. Damit wird auch eine Erklärung für die aufgetretenen Unterschiede zwischen in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen geboten (19, 20, 22, 47).

Ähnliche Versuche über die Wirkung des DHEA's und seiner Konjugate auf die G-6-PDH aus der Leber (35), Placenta (23), Ovarien (36) und Testes (24) brachten vergleichbare Ergebnisse.

Marks und Banks (19), die auch mit einer gereinigten G-6-PDH menschlicher Erythrozyten (K_M -Wert: $3,5 \times 10^{-5} \text{ M}$) arbeiteten, forderten für das Zustandekommen einer Enzymhemmung durch Steroide das Vorhandensein einer Oxo-Gruppe

an C-17 oder C-20, während weitere Hydroxy- oder Oxo-Gruppen, etwa an C-3 oder Doppelbindungen bei C-4(5) oder C-5(6), nur einen kleinen Einfluss auf die Hemmwirkung der Steroide haben sollten.

Diese Vorstellungen lassen sich jedoch nicht mit den obigen Ergebnissen in Einklang bringen, da DHEA-sulfat und DHEA-glucuronosid praktisch wirkungslos blieben, DHEA-sulfatid dagegen weitaus wirksamer war als das freie Steroid.

Eine 3-Hydroxy- (oder 3-Oxo-)Gruppe ist daher sicher an den Wechselwirkungen zwischen Steroid und Enzym beteiligt, die zu der nicht-kompetitiven Hemmung führen. Die Veresterung der äquatorialen 3 β -Hydroxy-Gruppe an C-3 mit Sulfatidsäure im Verein mit der Oxo-Gruppe an C-17 stellen offenbar die optimale Struktur des allosterischen Inhibitors dar. Negative Ladungen, wie sie in den Anionen des DHEA-sulfats oder des -glucuronosids auftreten, verhindern demgegenüber die zu fordernde Bindung des Steroids an das Proteinmolekül, die durch lipophile Eigenschaften - wie im freien Steroid oder Sulfatid - begünstigt wird.

Abschließend soll auf die Auswirkungen eingegangen werden, die sich bei der Erniedrigung des physiologischen DHEA-sulfatspiegels im Blut und im Urin auswirken. Der Mangel an DHEA-sulfatid hervorgerufen wird, kommt es durch Wegfall der

1. Durch beschleunigte Synthese der Fettsäuren erfolgt eine verstärkte Biosynthese von Lipoiden. Erhöhte Plasmaspiegel von Triglyceriden und Cholesterin wurden durch Zufuhr von DHEA-sulfat gelegentlich normalisiert (1).

2. In den Thrombozyten ist der PPZ der Hauptenergie-lieferant. Bei DHEA-Mangel findet man daher eine beschleunigte Synthese des Thromboplastins, welches als Hauptbestandteil ein Phospholipid aufweist. Als Folge tritt sodann erhöhte Thromboseneigung auf.

3. Bei Gicht erfolgt im Rahmen einer erhöhten PPZ-Aktivität bekanntlich ein vermehrter Einbau von C-1-Verbindungen in Purinkerne durch verstärkte Bildung von Tetrahydrofolsäure. In diesem Zusammenhang sei vermerkt, daß Gichtkranke kein oder nur wenig DHEA im Harn ausscheiden.

4. Bei gewissen Formen des Diabetes mellitus kommt es durch DHEA-Mangel wahrscheinlich zu verstärkter Reduktion der Disulfidbrücken im Insulin und damit zu einer Inaktivierung des Hormons.

5. Da DHEA auch als Präcursor von Androgenen und Oestrogenen anzusehen ist, kommt es bei DHEA-Mangel zu einer Störung der Steroidbiosynthese. So wird z.B. eine Verstärkung der Symptome von Androgenen Oestrogenen bei Akne vulgaris als mitverantwortlich für diese Erkrankung

angesehen. Kann in Hauteluaten von aknekranken Personen ein Überwiegen des einen oder des anderen Steroids nachgewiesen werden, so bringt die zusätzliche Gabe von DHEA-sulfat in vielen Fällen eine Normalisierung des gestörten Hormongleichgewichts und eine Besserung der klinischen Bildes (46, 5).

6. Als ein weiteres Beispiel soll der Oestrogenmangel in der Menopause angeführt werden. Der Plasmaspiegel von sulfokonjugiertem DHEA ist hier zumeist ebenfalls erniedrigt. Bei DHEA-Zufuhr steigt der Plasmaspiegel sowie die Ausscheidung von Oestrogenen deutlich an (11).

VI. Zusammenfassung

Nach Darlegung der Rolle der G-6-PDH im Intermediärstoffwechsel und der Bedeutung des Nebennierenrindensteroids DHEA wurde in verschiedenen Untersuchungsreihen der hemmende Einfluß dieses Steroids und seiner Konjugate (Sulfat, Sulfatid, Glucuronosid) auf die G-6-PDH menschlicher Erythrocyten untersucht. Die Versuche umfassten Messungen der G-6-PDH-Aktivität in hämolysierten Erythrocyten unter Einwirkung von DHEA und seinen Konjugaten, eine Prüfung der Wirksamkeit bestimmter Verbindungen nach Penetration durch die intakte Zellmembran und schließlich ihren Einfluß auf das gereinigte Enzym.

Es zeigte sich, daß das lipophile Sulfatid - ob synthetisch, biosynthetisch oder aus Plasma gewonnen - die größte nicht-kompetitive Hemmwirkung besaß. Bei gleicher Konzentration bewirkte das freie Steroid eine deutlich geringere Hemmung, während wasserlösliches Sulfat oder Glucuronosid sich im Enzym-Hemmtest als wirkungslos erwiesen.

Auf Grund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse, die mit anderen Arbeiten übereinstimmen, wird angenommen, daß das lipophile DHEA-sulfatid unter physiologischen Bedingungen die G-6-PDH-Aktivität reguliert.

VII. Literaturverzeichnis

1. ADLERCREUTZ, H., T. LUUKKAINEN und A. SVANBORG:
Simultaneous determination of urinary
estrogens, individual 11-deoxy-17-keto-
steroids, total 17-ketosteroids, total
ketogenic steroids, pregnanediol and
plasma cortisol during the menstrual cycle
and in early pregnancy.
Ann. Med. exp. Biol. Fenn. 45, 277-284
(1967)
2. BAULIEU, E.E., C. CORPEchot, F. DRAY, R. EMILIOZZI,
M-C. LEBEAU, P. MAUVAIS-JARVIS und R. ROBET:
An adrenal-secreted "androgen": dehydro-
isoandrosterone sulfate. Its metabolism
and a tentative generalization on the
metabolism of other steroids.
Rec. Progr. Hormone Res. 20, 411-500 (1965)
3. BOLTE, E., S. MANCUSO, G. ERIASSON, N. WIKQUIST und
S. DICZFALUSY: Studies on the aromatiza-
tion of neutral steroids in pregnant women.
I. Aromatization of C₁₉-steroids by pla-
centary perfused tissue.
Acta endocrinol. 45, 333-344
(1964)

4. BRANDAU, H. und W. LUK: Der Einfluß von Steroidhormonen auf die Glucoseoxidation.
Geburtsh. und Frauenheilk. 28, 1074-1075 (1968)
5. BREHM, G., LACHNER, G.W. OERTEL et al.: Quantitative Bestimmungen von Dehydroepiandrosteron, androsteron, Ätiocholanolon, Gesamtoestrogen und Testosteron im Plasma und Hauteluaten bei Acne vulgaris.
Arch. Klin. Exp. Derm. 234, 117-124 (1969)
6. BREUER, H.: Comparative studies on aromatic neutral steroids in man.
Acta endocrinol. (k'hvn) 40, 111-122 (1962)
7. BONDY, B. und C. CASTIGLIONE: Studies on pyrogenic steroids. I. Separation, identification, and measurement of unconjugated dehydroepiandrosterone, etiocholanolone, and androsterone in human plasma.
J. clin. Invest. 40, 400-407 (1961)
8. BANN: The primary oxidation product of enzymatic glucose-6-phosphate oxidation.
J. Biol. Chem. (Baltimore) 194, 417-425

9. DIXON, M. und E.C. WEBB: Enzymes. 2. Auflage
London 1964
10. GLOCK, G.E. und P. McLEAN: Further studies on properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver.
Biochem. J. 55, 400-408 (1953)
11. HEINEN, G., W. RINDT und G.W. OERTEL: 37. Versammlung
dtsh. Ges. Gynäk. zu Lübeck-Travemünde
Arch. Gynäk. 207, 385 (1969)
12. HOLLMANN, S. Nicht-glykolytische Stoffwechsellaage
der Glucose.
Stuttgart 1961
13. HUDSON, B. und G.W. OERTEL: Determination of dehydro-
epiandrosterone and total neutral 17-keto-
steroids in human plasma.
Anal. Biochem. 2, 248-262 (1961)
14. HUNTER, A. und C.E. DOWNS: The inhibition of arginase
by amino acids.
J. biol. Chem. 157, 427-446 (1945)
15. KNAPSTEIN, P., F. WENDLBERGER und G.W. OERTEL:

C₁₉-steroid glucuronosides in menschlichem Plasma nach i.v.-Injektion von freiem 7 -³H-DHEA.

Europ. J. Biochem. 2, 384-389 (1967)

16. LEVY, H.R.: The interaction of mammary glucose-6-phosphate dehydrogenase with pyridine nucleotides and 3 β -hydroxy-androst-5-en-17-one. J. biol. Chem. 238, 775-784 (1963)

17. LINEWEAVER, H. und D. BURK: Determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666 (1934)

18. LORIAUX, D.L., J.R. LEHMANN, R.H. KAUFMANN und M.W. NOALL: Evidence that testosterone and dehydroepiandrosterone sulfate do not contribute to urinary epitestosterone in the Stein-Leventhal Syndrome. Steroids 8, 377-383 (1968)

19. KASS, I. und J. BANKS: Inhibition of mammalian glucose-6-phosphate dehydrogenase by steroids. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 46, 442-452 (1960)

20. MARKS, P.A., A. SZEINBERG und J.BANKS: Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase of normal and mutant human subjects.
J. biol. Chem. 236, 10-17 (1961)
21. McDONALD, P.C., A. CHAPDELAINE, O. GONZALES, E. GURPIDE, R. VANDE WIELE und S. LIEBERMAN: Studies on the secretion and interconversion of the androgens. III. Results obtained after the injection of several radioactive C₁₉-steroids, singly or as mixtures.
J. clin. Endocr. Metab. (Springfield) 25, 1557-1568 (1965)
22. McKERNS, K.W. und E. KALEITH: Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by hormones.
Biochem. biophys. Res. Comm. 2, 344-348 (1960)
23. MENZEL, P., M. GOBBERT und G.W. OERTEL: Effects of DHEA and its conjugates upon the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human placenta.
Hormone Metab. Res. 2, 225-227 (1970)
24. MENZEL, P. und G.W. OERTEL: Inhibition of testicular glucose-6-phosphate dehydrogenase by dehydroepiandrosterone and its conjugates.

Clin. chim. Acta (Amst.) 29, 195-196
(1970)

25. MORATO, T., A.E. LEMUS und C. GUAL: Efficiency of dehydroepiandrosterone sulphate as an estrogen precursor (1).
Steroids, Suppl. 1, 59-74 (1965)
26. NEGELEIN, E. und W. GERISCHER: Verbesserte Methode zur Gewinnung des Zwischenferments aus Hefe.
Biochem. Z. 284, 289-296 (1936)
27. OERTEL, G.W.: Über Steroid-Konjugate im Plasma.
XII. Plasmaspiegel verschiedener Steroid-Konjugate in Nebennierenvenen-, Leber-venen- und Femoralvenen-Blut.
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chemie 336, 236-247 (1964)
28. OERTEL, G.W.: Über Steroid-Konjugate im Plasma.
I. Isolierung von Sulfat-, Phosphat- und Lipoid-haltigen 17-Ketosteroidkonjugaten aus menschlichem Blutplasma.
Biochem. Z. 334, 431-440 (1961)
29. OERTEL, G.W.: Über Steroid-Konjugate im Plasma.

X. Biosynthese eines lipophilen DHEA-Konjugats.

Biochem. Z. 339, 125-134 (1963)

30. OERTEL, G.W.: Synthese von Sulfatidyl-dehydroepiandrosteron.
Naturwiss. 48, 621 (1961)
31. OERTEL, G.W. und K. GROOT: Über Steroid-Konjugate im Plasma. XIII. Isolierung, Eigenschaften und Zusammensetzung eines biosynthetischen, lipophilen DHEA-Konjugats.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 341, 1-9 (1965)
32. OERTEL, G.W., K. GROOT und P. BRÜHL: Über Steroid-Konjugate im Plasma. XIV. Zur Bindung von sulfokonjugierten Steroiden an Plasma-proteine.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 341, 10-21 (1965)
33. OERTEL, G.W., K. GROOT und D. WENZEL: On lipophile steroid conjugates. II. In vivo biogenesis of estrogens from biosynthetic dehydroepiandrosterone sulphatide.
Acta endocrinol. (K'hvn) 49, 533-540 (1965)

34. OERTEL, G.W., P. KNAPSTEIN und L. TREIBER: Über Steroid-Konjugate im Plasma. XIX. Direkter und indirekter Metabolismus von i.v. verabreichten ^3H und ^{35}S -markierten Androstendiolon-sulfats. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 345, 221-235 (1966)
35. OERTEL, G.W., P. MENZEL und D. BAUKE: Effects of dehydroepiandrosterone and its conjugates upon the activity of glucose-6-phosphate-dehydrogenase. Clin. chim. Acta (Amst.) 27, 197-201 (1970)
36. OERTEL, G.W., P. MENZEL und D. BAUKE: Effects of dehydroepiandrosterone and its conjugates upon the activity of glucose-6-phosphate-dehydrogenase. III. Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human ovarian tissue. Steroidologia 1, 2-7 (1970)
37. OERTEL, G.W. und L. TREIBER: Vorkommen und Stoffwechsel von C_{19} -Steroiden in der Haut. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 11-21 (1968)

38. OERTEL, G.W., L. TREIBER und W. RINDT: Direct aromatization of C_{19} -steroids sulphates. *Experientia* 23, 97-98 (1967)
39. SIITERI, P.K. und P.C. McDONALD: Estrogen formation in human pregnancy. *J. clin. Endocrinol. Metab.* (Springfield) 26, 751-761 (1966)
40. SIPERSTEIN, M.D. und V.M. FAGAN: Studies on the relationship between glucose oxidation and intermediary metabolism. II. The role of glucose oxidation in lipogenesis in diabetic rat liver. *J. clin. Invest.* 37, 1196-1201 (1958)
41. SMITH, O.W. und K.J. RYAN: Biogenesis of estrogens by the human ovary: the conversion of androstenedione-4-C-14 to estrone and estradiol in high yield. *Endocrinology* 69, 869-872 (1961)
42. SONKA, J., I. GREGOROVA, M. JIRANEK, F. KÖLBEL, und Z. MATYS: Defekt des DHEA - Ein neues Syndrom? *Endokrinologie* 47, 152-161 (1965)
43. SONKA, J., I. GREGOROVA und J. PAV: Dehydroepiandro-

sterone in obese diabetics.

Lancet 2, 44-45 (1964)

44. SONKA, J., I. GREGOROVA, Z. SLABOCHOVA und R. RATH:
Ein Beitrag zur Pathophysiologie des
Dehydroepiandrosterons bei Fettsucht.
Endokrinologie 45, 115-121 (1963)
45. SONKA, J., I. GREGOROVA, Z. SLABOCHOVA, R. RATH und
A. ZBIRKOVA: Einfluß verschiedener Reduktionsregime auf die Aktivität des
Pentosenzyklus in den Erythrozyten.
Endokrinologie 45, 174-186 (1963)
46. TREIBER, L. und G.W. OERTEL: Steroide und Haut.
I. Mitteilung: Zur Bestimmung verschiedener C_{19} - und C_{18} -Steroide in Hauteluaten.
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 5,
367-369 (1968)
47. TSUTSUI, E.A., P.A. MARKS und P. REICH: Effects of
dehydroepiandrosterone on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and
reduced triphosphopyridine nucleotide formation in adrenal tissue.
J. biol. Chem. 237, 3009-3013 (1962)

48. VIHKO, R.: Gas chromatographic-mass spectrometric studies on solvolizable steroids in human peripheral plasma.
Acta endocrinol. (K'hvn) 52, Suppl. 109 1-67 (1966)
49. WALLER, H.D.: Zur Differentialdiagnose der hereditären nichtsphärozytären hämolytischen Anämien.
Med. Welt 46, 2338-2345 (1963)
50. WARBURG, O. und W. CHRISTIAN: Über Aktivierung der Robinsonschen Hexose-Mono-Phosphorsäure in roten Blutzellen und die Gewinnung aktivierender Fermentlösungen.
Biochem. Z. 242, 206-227 (1931)
51. WARBURG, O. und W. CHRISTIAN: Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase.
Biochem. Z. 310, 384-421 (1941)
52. WARBURG, O., W. CHRISTIAN und A. GRIESE: Wasserstoffübertragendes Coferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweise.
Biochem. Z. 282, 157-205 (1935)
53. WOTIZ, H.H., J.W. DAVIS, H.M. LEMON und M. GUT: Studies in steroid metabolism.
V. The conversion of testosterone-4-C¹⁴

to estrogens by human ovarial tissue.

J. biol. Chem. 222, 487-495 (1956)

Herrn Professor Dr. med. Volker Friedberg,
Direktor der Universitätsfrauenklinik Mainz,
bin ich für die Arbeitsmöglichkeit an seiner
Klinik und die Unterstützung mit Sachmitteln zu
Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Georg W. Oertel,
Abteilungsvorsteher der Abteilung für experi-
mentelle Endokrinologie Mainz, danke ich recht
herzlich für die Überlassung des Themas, sowie
für die Unterstützung und die wertvollen Rat-
schläge zu dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. Peter Menzel, Assistent an der
Universitätsfrauenklinik Homburg/Saar, danke ich
vielmals für die Anregungen und Diskussionen bei
der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 13. 3. 1944 wurde ich als Tochter des Schmiedemeisters Karl Rebelein und seiner Ehefrau Toni, geb. Kreiselmaier, in Ludwigshafen am Rhein geboren.

Von 1950 bis 1955 besuchte ich in Ruchheim, Kreis Ludwigshafen, die Volksschule und anschließend in Ludwigshafen das Städt. Mädchengymnasium, an dem ich im März 1964 das Abitur bestand.

Im Sommersemester 1964 begann ich an der Johannes-Gutenberg Universität in Mainz das Studium der Medizin, das ich nach Bestehen des Vorphysikums im Frühjahr 1965 und des Physikums im Herbst 1966 mit dem Staatsexamen im Juli 1970 abschloß.

Seit dem 18. Mai 1971 bin ich mit dem Dipl.-Geol. Wolfgang Zobel verheiratet.

Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich am Roten Kreuz Krankenhaus in Wiesbaden, an der Städt. Klinik in Darmstadt und an der Universitätsklinik in Mainz ab.

Im April 1972 erhielt ich die Approbation als Arzt.

